

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Zakościelnej pt.:

„Związek genu indukowanej syntetazy tlenu azotu NOS2 z przerostem lewej komory serca u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej”.

Stenoza aortalna (AS) to jedna z głównych wad zastawkowych serca, stwierdzana u osób w wieku podeszłym. Zwężenie lewego ujścia tętniczego jest następstwem stopniowego zmniejszania się ruchomości płatków oraz zmniejszenia pola otwartej zastawki w stosunku do wartości prawidłowej. W miarę stopniowego zwężenia ujścia zastawki następuje wzrost ciśnienia skurczowego w lewej komorze (LV). Mechanizmy kompensacyjne prowadzą do zwiększenia grubości i kurczliwości jej ścian przez co pacjenci mogą nie mieć objawów przez długi czas pomimo znacznego zwężenia pola zastawki. Postępujący przerost prowadzi do zmniejszenia podatności komory i pojawienia się objawów klinicznych, najczęściej duszności wysiłkowej. Wraz z postępem choroby i wzrostu oporu w drodze wyrzutu LV oraz postępującego wzrostu ciśnienia późnoskurczowego i późnorozkurczowego prowadząc do rozstrzeni LV, ścieńczenia ścian i spadku frakcji wyrzutowej. U większości pacjentów objawy te występują, zanim dojdzie do dysfunkcji LV, ale u niektórych w momencie rozpoznania stwierdza się już upośledzoną czynność komory i jawną klinicznie niewydolność serca. Kompensacyjny przerost mięśnia LV, jak również późniejsza postępująca rozstrzeń wraz ze spadkiem frakcji wyrzutowej stanowią niezależne czynniki zgonu i powikłań sercowo naczyniowych w okresie przed, jak i po ewentualnej korekcie zabiegowej. Chorzy z AS i wtórnym koncentrycznym przerostem lub przebudową o typie koncentrycznym LV wykazują także gorsze rokowanie po wymianie zastawki.

Czynnik mechaniczny jest głównym bodźcem inicjującym proces przerostu, a ciśnienie krwi jest najsilniejszym determinanem masy lewej komory serca. Niemniej jednak istnieje wiele dodatkowych czynników, mających wpływ na rozwój przerostu LV taki jak wiek, płeć, rasa, masa ciała, choroby współistniejące, jak również układ współczulny, układ renina-angiotensyna-aldosteron czy w końcu czynniki genetyczne. Do tej pory brak jest pewnych danych czy czynnikiem odpowiedzialnym za stymulację miokardium do przerostu jest bodziec fizyczny pod postacią stresu mechanicznego wynikającego z przeciążenia objętościowego i/lub ciśnieniowego wtórnego do rozwijającej się wady, czynników neurohormonalnych czy też odpowiedź zapalna uruchamiająca cytokiny i czynniki wzrostu. Wydaje się, że proces prowadzący do przerostu i przebudowy geometrii LV jest złożony, stanowiąc wypadkową zaburzenia równowagi pomiędzy pro- i antyhypertroficznymi ścieżkami sygnałowymi, na co wpływ może mieć również podłoże genetyczne.

Nasilenie przerostu miokardium u pacjentów ze stenozą aortalną wykazuje dużą zmienności osobniczą. Dotychczas wykazano niewielki stopień korelacji między stopniem nasilenia wady a przerostem mięśnia LV. U chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej obserwuje się istotne różnice pod względem masy LV od wartości prawidłowych do znacznego jej przerostu stwierdzane na tym samym etapie zaawansowania wady, co wskazuje na złożoność procesu i jego wieloetiologiczny charakter. Dotychczas niewiele jest dostępnych prac odnoszących się do oceny podłoża genetycznego przerost

lewej komory u pacjentów ze stwierdzanym zwężeniem zastawki aortalnej. Na obecnym etapie wiedzy najwięcej wiarygodnych dowodów wskazuje na obecność zmian w specyficznych genach układu renina-angiotensyna-aldosteron, w tym obecność wariantów genetycznych polimorfizmu delecyjno-insercyjnego (D/I) genu enzymu konwertującego angiotensynę oraz też polimorfizm T174M genu angiotensynogenu (AGT) czy też stwierdzany w badaniach *Horio* i wsp. polimorfizm receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) odpowiadających za rodzaj i stopień stwierdzanego przerostu u chorych ze AS.

Szczególnym zainteresowaniem badawczym mgr Eweliny Zakościelnej stała się ocena wpływu tlenku azotu (NO), związku o dużej aktywności biologicznej na regulację układu sercowo-naczyniowego, w kontekście przerostu mięśnia lewej komory w populacji chorych ze hemodynamicznie istotnym zwężeniem zastawki aortalnej. Rola NO w kontrolowaniu napięcia naczyń, a tym samym regulacji ciśnienia tętniczego jest dobrze znany i udokumentowany wynikami wielu badań. Wiadomo, że NO wpływa także na transmisję synaptyczną, mechanizmy związane z odpowiedzią immunologiczną oraz może regulować transkrypcję genów, translację mRNA oraz wprowadzać potranslacyjne modyfikacje białek. NO syntetyzowany jest endogennie w reakcji katalizowanej przez trzy izoformy enzymu syntetazy tlenku azotu (NOS): neuronalną (nNOS, NOS-1), indukowalną (iNOS, NOS-2) oraz śródbłonkową (eNOS, NOS-3). Wszystkie 3 izoformy są obecne w komórkach miokardium, przy czym indukowalna NOS, nie zależna od stężenia wewnątrzkomórkowego wapna nie bierze udziału w wytwarzaniu wartości bazowej NO, lecz jej aktywność ulega ekspresji głównie w odpowiedzi prozapalnej. Dotychczas ukazało się wiele prac opisujących polimorfizmy w sekwencji ludzkiego promotora NOS-2 z licznymi stanami patologicznymi u ludzi, jak nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, wybrane rodzaje nowotworów, choroba Alzheimera czy astma. Wykazano toksyczny wpływ nadmiaru NO na kurczliwość kardiomiocytów oraz związek iNOS z rozwojem niewydolności serca w przebiegu kardiomiopatii rozstrzeniowej czy choroby niedokrwiennej serca. Badania na modelu zwierzęcym wykazały, że wysoka ekspresja genu NOS-2 w miokardium wiązała się z przerostem i włóknieniem tkanek miokardium, a delecja genu prowadziła do zmniejszenia indukowanego przerostu lewej komory. Hipotezą badawczą rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Zakościelnej stała się próba określenia związku czynników genetycznych w locus genu NOS-2 z przerostem mięśnia LV u chorych ze zwężeniem lewego ujścia tętniczego. Za miarę geometrii i kryterium przerostu mięśnia LV Doktorantka przyjęła wartość masy lewej komory indeksowana do wzrostu oraz współczynnik względnej grubości ścian (RWT).

Grupę badaną stanowiło 657 pacjentów hospitalizowanych w Klinice Wad Nabytych Serca Instytutu Kardiologii im. kd. Stefana Wyszyńskiego w Aninie, homogenna populacja chorych, u których przy pomocy klasycznej metody, jaka jest echokardiografia przezklatkowa z oceną dopplerowską rozpoznano istotne zwężenie zastawki aortalnej i zakwalifikowano do korekty chirurgicznej wady. Z badania wykluczano chorych ze współistniejącą co najmniej umiarkowaną niedomykalnością aortalną, jak również inną istotną hemodynamicznie wadą zastawkową serca.

Przedstawiona do recenzji praca składa się z 104 stron tekstu zebranych w typowy układ rozdziałów dla pracy doktorskiej. Praca zawiera 5 rycin i 25 tabel stanowiących doskonale uzupełnienie

tekstu. Piśmiennictwo w liczbie 185 jest dobrane odpowiednio i stanowi odwołanie do aktualnych doniesień z ostatnich lat. Praca została przygotowana wyjątkowo starannie. Pani mgr Ewelina Zakościelna nie jest lekarzem, więc niektóre stwierdzenia medyczne są mało precyzyjne, ale nie powoduje to istotnych zaburzeń i rozumienia tekstu podczas jego lektury. Pomimo, że Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów stylistycznych i interpunkcyjnych pracę czyta się dobrze, jest napisana w sposób jasny i zrozumiały, a poszczególne części są ze sobą logicznie powiązane.

Rozdział WSTĘP Doktorantka rozpoczyna od bardzo zwięzłego przedstawienia epidemiologii, patofizjologii oraz znaczenia klinicznego wady zastawkowej serca pod postacią AS oraz wnikliwej analizy czynników prowadzących do następstw hemodynamicznych i strukturalnych, zwłaszcza przerostu mięśnia LV. W tej części pracy Doktorantka zawarła także wnikliwą i krytyczną analizę aktualnej wiedzy w zakresie genetycznego podłoża stwierdzanych zmian oraz określenie potencjalnego związku czynników genetycznych występujących w genie NOS-2 z przerostem mięśnia LV u chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej. Tym samym bardzo obszerny wstęp rozprawy może być osobnym artykułem przeglądowym zawierającym aktualny stan wiedzy na temat omawianego zagadnienia.

Doktorantka formułuje, jeden złożony cel pracy, który został rozwinięty i szczegółowo opracowany w rozdziale WYNIKI, a poszczególne elementy zostały przez Doktorantkę poddane wnikliwej oraz krytycznej ocenie i dyskusji w rozdziale OMÓWIENIE WYNIKÓW.

Protokół badania, w tym bardzo obszerny i szczegółowy opis metod badawczych i oznaczeń genetycznych został szczegółowo omówiony w rozdziale MATERIAŁ i METODYKA w sposób nie budzący zastrzeżeń i zgodny z aktualną wiedzą i obowiązującymi zaleceniami. Jednak Doktorantka nie ustrzegła się tu pewnych niedociągnięć, jak chociażby braku szczegółowych informacji dotyczących kryteriów włączenia do badania, które powinien pozyskać czytelnik na tym etapie pracy. Wiedzę na temat grupy badanej, którą jak wspomniałem wcześniej stanowili chorzy z istotną hemodynamicznie stenozą aortalną zakwalifikowani do korekty chirurgicznej wady pozyskujemy dopiero wracając do szczegółowej analizy treści STRESZCZENIA umieszczonego na początku pracy. Brak jest także informacji co stanowiło materiał badany oraz sposób jego pobrania. Na tym etapie rozprawy doktorskiej brak jest także precyzyjnego opisu zastosowanych metod statystycznych, poza wzmianką osoby wykonującej obliczenia tj. Pana dr Grzegorza Plachę, który to zapewne gwarantuje wybór odpowiednich i wiarygodnych metod, choć w tym zakresie czuje się pewien niedosyt. Brak jest także informacji na temat czym podyktowana była wielkość grupy badanej, założeniami statystycznymi czy też a priori zdefiniowanym czasem włączania chorych do badania? Tabela 2 zawarta w rozdziale MATERIAŁ i METODYKA zawierająca szczegółowe dane antropometryczne, kliniczne oraz echokardiograficzne badanej grupy chorych stanowi raczej część zebranych wyników i powinna znaleźć się w dalszej części rozprawy doktorskiej.

Uzyskane wyniki Doktorant przedstawił w postaci czytelnych rycin i tabel, a na ich podstawie sformułował zwięzłe i logiczne wnioski stanowiące odpowiedź na postawione sobie cele w pracy. Patrząc okiem klinicysty, tej części pracy brakuje bardziej szczegółowego opisu grupy badanej, dotychczasowego przebiegu oraz objawowości choroby, opisu zastosowanych metod chirurgicznych oraz chociażby krótkoterminowej, wewnątrzszpitalnej obserwacji wraz z opisem potencjalnych

okołozabiegowych powikłań, które mogą mieć związek ze współistniejącym przerostem mięśnia lewej komory, do czego odwołuje się Doktorantka we WSTĘPIE swojej pracy.

W rozdziale OMÓWIENIE WYNIKÓW Doktorantka w sposób krytyczny ustosunkowuje się do uzyskanych wyników oraz konfrontuje je z danymi dostępnymi w aktualnym piśmiennictwie medycznym. Krytyczne spojrzenie na ograniczenia przeprowadzonego projektu badawczego, ich rzeczowa analiza oraz ich potencjalny wpływ na uzyskane wyniki świadczy o dojrzałości i doświadczeniu badawczym Doktoranta.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułował zwięzłe i precyzyjne wnioski oraz na podstawie dotychczasowej wiedzy oraz uzyskanych wyników podjęła się także próby wyznaczenia roli jaką pełni gen NOS-2 oraz kodowane przez niego białko, enzym iNOS w układzie sercowo-naczyniowym oraz zarysowania potencjalnego szlaku sygnałowego mogącego prowadzić do przerostu LV serca u pacjentów ze zwężeniem zastawki aortalnej. Doktorantka wykazała bowiem, że gen NOS-2 może odgrywać rolę w rozwoju przerostu lewej komory u pacjentów ze zwężeniem zastawki aortalnej, a warianty alleliczne polimorfizmu rs 2779249 obszaru promotorowego genu mogą mieć wpływ na typ rozwijanego przerostu.

Niezależnie od zgłaszanych uwag pragnę pokreślić, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Zakościelnej została przygotowana bardzo rzetelnie a autorka wykazała się dużą starannością oraz dojrzałością prezentując swój warsztat zawodowy oraz szeroką wiedzę i dociekliwość naukową.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że protokół badania został zaaprobowany i na drodze postępowania konkursowego uzyskał finansowanie w ramach programu TEAM finansowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej oraz Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, grantu naukowego na projekty zespołowe prowadzone przez wybitnych uczonych z całego świata w jednostkach naukowych lub przedsiębiorstwach w Polsce, pracujących w najbardziej innowacyjnych obszarach.

Podsumowując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Eweliny Zakościelnej spełnia wszystkie warunki określone w ustawie o tytułach oraz stopniach naukowych i wnoszę do Wysokiej Rady I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. n. med. Dariusz A. Kosior, prof. PAN,
Klinika Kardiologii i Nadciśnienia Tętniczego z Pracownią Elektrofizjologii Klinicznej
Centralny Szpital Kliniczny
Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji w Warszawie

Warszawa dn. 13.01.2019